Experimentelle Untersuchungen
über die
Einwirkung von Erythrophlein und Nervocidin auf das Ziliarepithel des Auges

---

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Friedrich-Alexander-Universität Erlangen

vorgelegt von

Friedrich Pfeuffer
aus Forchheim i. Ofr.

Erlangen 1931

---

von Münchowsche Universitätsdruckerei Otto Kindt, G. m. b. H., Gießen

1999.214

Referent: Privatdozent Dr. Hans Schmelzer,
Dekan: Professor Dr. Dr. Schübel.

Tag der mündlichen Prüfung: 2. April 1931.

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Seit den Tagen A. v. Graefes bis auf unsere Zeit hat die Ophthalmologie wohl kein anderes Problem so in Atem gehalten als die Frage nach dem Wesen des grünen Stars. Und auch heute kennen wir trotz aller Forschungsarbeit noch nicht die letzten Ursachen des Glaukoms, auch heute noch ist die Frage nicht geklärt, welche schädlichen Einflüsse die Drucksteigerung des Auges, die schon A. v. Graefe als das Kardinalsymptom des grünen Stars erkannt hatte, herbeiführen. Aber zwei Teilfragen aus dem Gebiet der Glaukomforschung, zwei Fragen von grundlegender Bedeutung allerdings, dürfen wir heute doch als gesichert ansehen: Einmal die Frage nach dem Flüssigkeitswechsel im Auge und zum andern die Frage nach der Mechanik der intraokularen Drucksteigerung.

Besonders auf Grund der ausgedehnten Arbeiten Lebers (1) und Seidels (2) müssen wir heute die Frage nach einem Flüssigkeitswechsel im Auge bejahen. Demnach können wir über das Zustandekommen der intraokularen Drucksteigerung auf Grund vielfacher klinischer und experimenteller Untersuchungsergebnisse sagen, daß dann, wenn der Abfluß des Kammerwassers aus der Vorderkammer irgendwie gehemmt ist, sei es durch Verlegung oder Verlötung der Abflußwege, die intraokulare Spannung steigt. Die letzten Ursachen jedoch, welche zu dieser Abflußhemmung des Kammerwassers führen, haben noch keine eindeutige Erklärung gefunden: vielleicht sind es Störungen innersekretorischer oder gefäßneurotischer Natur, die zu irgend einem lokal-degenerativen Prozeß der inneren Augengewebe führen, vielleicht liegt eine besondere Topographie des Kammerwinkels vor, die dominant erblich ist und unter besonderen Umständen zu einer Verlegung der Abflußwege des Kammerwassers Veranlassung gibt u. dgl. mehr.

Solange wir aber das Glaukom in seiner Pathogenese noch nicht kennen, kann auch die Therapie des Glaukoms keine kausale sein. Wir sind aber imstande, das deletäre Hauptsymptom des grünen Stars, die intraokulare Drucksteigerung erfolgreich zu bekämpfen, und zwar konservativ-medikamentös oder operativ. Nur dann aber ist die Behandlungsweise erfolgreich zu nennen, wenn sie vermag, die erhöhte Augenspannung zur Norm herabzusetzen, d. h. zu bewirken, daß wieder eine annähernd normale Flüssigkeitsmenge aus dem Auge abfließen kann (3).

Diese augendruckherabsetzende Wirkung besitzen nun in besonderem Maße die Miotica Pilocarpin und Eserin (nach Einträufeln der wässerigen Lösungen in das Auge). Weniger zuverlässig wirkt in diesem Sinne auch das in den letztvergangenen Jahren viel besprochene Adrenalin, bzw. Glaukosan. Auf die Wirkungsweise dieser Mittel hier einzugehen ist unmöglich, ohne den Rahmen dieser Arbeit zu überschreiten. Es soll vielmehr hier versucht werden, der augendruckherabsetzenden Wirkungsweise zweier kaum bekannter Pharmaka nachzugehen, dem Nercocidin und Erythrophlein.

Diese beiden Pharmaka sind sehr starke Anaesthetika und als solche seit langen Jahren bekannt. Schon in den 80er Jahren wurde das Erythrophlein von verschiedenen Augenärzten benützt, um eine Hornhaut-Anaesthesie herbeizuführen. Wegen seiner entzündlichen Nebenwirkungen mußte das Mittel aber bald dem fast zur gleichen Zeit entdeckten Cocain weichen, da dieses Alkaloid den großen Vorteil hat, gleichzeitig anaemisierend zu wirken, was nur erwünscht ist.

Das Nervocidin ist ein Geheimpräparat, das von Dr. Dalma-Fiume im Jahre 1900 als Dentin und Pulpaanaesthetikum in die Zahnheilkunde eingeführt wurde. Es ist ein Alkaloid, das von einer hinterindischen Pflanze (Gasu-Basu) hergestellt wird. Der botanische Name dieser Droge wird jedoch von den Herstellern nicht bekannt gegeben, sodaß Nervocidin als Geheimmittel angesehen werden muß. Die exakte pharmakologische Untersuchung dieses Mittels führte

Hesse in dem Breslauer Pharmakologischen Institut Pohls durch. Er fand vor allem, daß die anaesthesierende Wirkung des Nervocidins auf die Cornea etwa 30mal stärker sei als die des Cocains.

Als Ascher 1928 daran ging, diese Eigenschaft des Nervocidins klinisch und im Tierversuch nachzuprüfen, fand er zu seiner Überraschung gleichzeitig auch eine starke hypotonisierende Wirkung des Mittels. Darüber hielt er auf dem Heidelberger Ophthalmologen-Kongreß 1928 einen Vortrag: „Über die langdauernde Herabsetzung des Augendrucks durch ein Anästhetikum" (4).

Ascher fand sowohl bei Anwendung des Nervocidins als auch des Erythrophleins außer stark anaesthesierender Wirkung auf die Hornhaut des Tier- und Menschenauges eine stärkere Herabsetzung der intraokularen Spannung. Er tropfte die Mittel in 1- und 2 prom. Lösung ein oder spritzte einige Teilstriche der 1 prom. Lösung unter die Bindehaut. Besonders die letztere Form der Verabreichung empfiehlt er als geeignet zur Glaukom-Behandlung.

Isa John (5) aus der Wiener Klinik Lindners prüfte das Mittel klinisch nach. Sie verwandte ausschließlich Nervocidin, das sie in 1- und 2 prom. Lösung (bei einem 5½jährigen Kind auch einmal in ½ prom. Lösung) einträufelte. Subkonjunktivale Injektionen nahm sie nicht vor. In der Zusammenfassung ihrer Arbeit sagt Isa John folgendes: „In 40 Fällen, darunter zum größten Teile sehr schmerzhaften, schwer entzündeten glaukomatösen Augen gelang es durch meist nur einmaliges Eintropfen von 1- oder 2 prom. Nervocidinlösung die Schmerzen vollkommen zu beseitigen, die Entzündungserscheinungen zurückzubringen und mitunter die Drucksteigerung zu beheben, in fast jedem Falle aber den Druck, wenn auch nur vorübergehend, herabzusetzen. Eine dauernde Schädigung des Auges, abgesehen von vorübergehenden leichten Veränderungen, wurden bisher nicht beobachtet."

Neuerdings beschäftigte sich auch Schmelzer mit der Untersuchung des Nervocidins und Erythrophleins (6). Er gelangte zu dem Ergebnis, daß es sich zwar empfehle,

das Nervocidin auf Grund seiner nachweisbar starken anaesthesierenden Wirkung auf die Hornhaut des Auges bei Patienten mit starken Augenschmerzen (Iridocyclitis, Keratitis, Verätzung des Bulbus usw.) als schmerzstillendes oder wenigstens schmerzlinderndes Mittel in 1- oder 2 prom. Lösung in die Augen einzuträufeln. Als Heilmittel des Glaukoms sei es jedoch abzulehnen; denn Schmelzer fand in zahlreichen experimentellen und klinischen Untersuchungen, daß der Augendruck zwar vielfach durch Nervocidin und Erythrophlein für kürzere oder längere Zeit herabgesetzt wird, meist aber nicht in dem Maße wie durch Pilokarpin, das zudem den Vorteil hat, keine Schädigung des Auges zu setzen. Nervocidin bewirkt nämlich fast immer bei Einträufelung der 1- oder 2 prom. Lösung eine Trübung der Hornhaut des Versuchsauges, bei subkonjunktivaler Injektion am Tiere sogar eine kräftige Chemosis, iritische Reizerscheinungen, ja manifeste Iritis serosa. Wegen der stark entzündlichen Erscheinungen, die nach subkonjunktivaler Injektion dieser Mittel auftraten, konnte sich Schmelzer bisher auch noch nicht dazu entschließen, am Menschenauge Nervocidin- oder Erythrophlein-Lösungen subkonjunktival einzuspritzen; er gebrauchte beide Pharmaka nur in der Form der Instillation, ebenso wie auch Isa John Nervocidin nur einträufelte.

In der Frage nach der druckherabsetzenden Wirkungsweise des Nervocidins vertrat Schmelzer in seinem Vortrag (6) die Anschauung, daß das Mittel als starkes Gift entzündungserregend auf die Gewebe des Auges und dadurch indirekt oder auch vielleicht direkt schädigend auf die Ciliarepithelien einwirke, in welchen wir mit Seidel die Quelle des Kammerwassers erblicken dürfen. Mit dieser reversiblen Vergiftung der Epithelien käme es vielleicht zu einer vorübergehenden Sekretionshemmung und damit auch zur Hypotonie.

Demgegenüber nimmt Ascher an, daß die Augendrucksenkung nach Erythrophleinbehandlung durch einen teilweisen Übertritt von Augenflüssigkeit in die Bulbushüllen zu erklären sei, wobei sie besonders in der Hornhaut zu

einer Quellung mit Volumkontraktion des Bulbusinhaltes Veranlassung gebe. Ascher regt an, ähnliche Gedankengänge auch auf andere, den Augendruck herabsetzende Medikamente als Grundlage für experimentelle Untersuchungen zu übertragen.

Isa John denkt an die Ausschaltung eines Reflexbogens, der sonst nach sensibler Irritation zu Vasodilatation mit erhöhter Gefäßdurchlässigkeit führe, ohne jedoch für ihre Theorie den experimentellen Beweis anzutreten.

Auf Veranlassung von Schmelzer unternahm ich es nun, den experimentellen Nachweis der reversiblen Vergiftung des Ciliarepithels zu erbringen als Stütze für die Annahme Schmelzers, die Hypotonie nach der Behandlung mit diesen beiden Mitteln könne durch eine Sekretionshemmung von Kammerwasser erklärt werden.

Zu diesem Zweck bediente ich mich der von Paul Ehrlich zuerst angegebenen und von dem Pathologen Graeff ausgebauten Methode der Indophenolblaureaktion oder „Nadireaktion" wie sie Graeff benannte. In die Ophthalmologie wurde diese Methode von Schmelzer (7) und Schall (8) gleichzeitig und unabhängig voneinander 1925 eingeführt.

Bevor auf die Versuchsanordnung dieser Arbeit und deren Ergebnisse näher eingegangen werden soll, seien in Anlehnung an Graeff (9) zunächst einige allgemeine Bemerkungen über den Wert der Nadireaktion für unsere Versuche gemacht.

Graeff greift als Nadioxydasen (ein von ihm geprägter Begriff) aus der großen Reihe der Fermente, die bei sämtlichen Lebensvorgängen eine wichtige Rolle spielen, die wichtigsten Oxydationsfermente heraus. Er faßt unter dieser Bezeichnung diejenigen Oxydasen zusammen, welche in der lebenden und überlebenden Zelle mit einem Gemisch von α-Naphthol und Dimethyl-p-phenylendiaminchlorhydrat eine mikroskopisch genau zu beobachtende, meist auch makroskopisch sichtbare Reaktion liefern, die sich in der Bildung des Indophenolblaus kundtut.

Von vorneherein sei betont, daß es sich bei diesen Untersuchungen um die Gewebszellen-Nadioxydase handelt und nicht um die myeloische Zellen-Oxydase, die sich auf das Vorkommen der myeolischen Zellen allein beschränkt und von der Gewebszellen-Nadioxydase wesentlich verschieden ist.

Nach dem heutigen Stand der Oxydasen-Forschung werden im großen und ganzen drei Gruppen von Oxydationsfermenten unterschieden, nämlich die Polyphenolasen, Peroxydasen und Katalasen, wobei die Wirkung der Katalasen einen Spezialfall der Peroxydasen darstellt (nur Umsetzung von H_2O_2). Man nimmt dabei an, daß die Phenolasen mit Phenolen direkt eine Reaktion geben, die Peroxydasen jedoch erst bei Zusatz von Hydroperoxyd. Da jedoch oft die gleiche Zelle verschiedene Reaktionen mit verschiedenen Substraten bildet, läßt sich eine scharfe Trennung zwischen den einzelnen Fermentgruppen nicht durchführen. Das ganze Gebiet ist noch ziemlich umstritten. Gleichwohl kann man aber mit Graeff dahin übereinstimmen, daß er den verschiedenen Ausfall der zahlreichen Oxydase-Reaktionen in der verschieden gearteten Oxydabilität des Substrates sucht. Daher werden wir in einem oxydablen Substrat um so mehr Stellen finden, die mit ihm eine Reaktion geben, je leichter oxydabel es ist.

Zum Nachweis der Oxydasen in den Zellen ist es wichtig, sie sichtbar zu machen. Als notwendige Substrate sind also bei dem Prozeß zu fordern: a) das oxydable Substrat, b) der Sauerstoff der Luft, c) die fermenthaltige Zelle.

Diesen Prozeß faßt Graeff in folgende Formel zusammen:

$$\text{Oxydable Substanz} + \frac{\text{O der Luft}}{\text{fermenthaltige Zelle}} \rightarrow \text{intrazelluläre Farbstoffbildung.}$$

Wenn wir als oxydable Substanz in diese Gleichung das Nadi-Gemisch einführen, lautet die Formel folgendermaßen:

$$\frac{\alpha\text{-Naphthol}}{\text{Dimethyl-p-phenylendiaminchlorhydrat}} +$$

$$\xrightarrow[\text{ferment-haltige Zelle}]{\text{O der Luft}} \text{Indophenolblau.}$$

Es ist also bei diesem Vorgang zur Synthese von α-Naphthol und Dimethyl-p-Phenylendiaminchlorhydrat zur Leukoverbindung Indophenolweiß zunächst ein O-Atom nötig und sodann ein zweites, um die Küpe zu Indophenolblau zu oxydieren.

Auf Grund dieser farbstoff-bildenden Reaktion ist es leicht möglich, einen fermentativen Vorgang in der Zelle sichtbar zu machen und zu beobachten. Dabei ist zu bemerken, daß die Gewebs-Nadioxydase sehr empfindlich ist gegen Hitze, Fäulnis, Zellgifte und vor allem auch gegen Fixierungsflüssigkeiten (Alkohol und Formalin), zum Unterschied von der Myelonadioxydase, die wir im formolfixierten Präparat ohne weiteres nachweisen können. Nach Graeff sind also die Nadioxydasen Oxydationsfermente mit katalysatorischer Wirkung, die nicht von präformierten Granulis abhängig sind, sondern sich im Protoplasma der Gewebszellen ubiquitär vorfinden.

Auf alle Fälle dürfen wir in der Nadi-Reaktion eine wertvolle biologische Reaktion erblicken, die uns gestattet aus der Intensität ihres Ausfalles in den Zellen der verschiedenen Gewebe Schlüsse zu ziehen auf die Intensität der in ihnen ablaufenden vitalen Oxydationsprozesse. So wies z. B. Graeff nach, daß ein tätiger Muskel reichliche Mengen von Gewebsoxydase besitzt, während der ruhende oder atrophische Muskel nur spärliche Mengen aufweist. Ohne direkt von Sauerstoff- und Reduktionsorten zu sprechen, die nach neuester Meinungsäußerung Graeffs (briefliche Mitteilung an Dr. Schmelzer) vielleicht an dieselben Orte in den Zellen zu verlegen sind, stellt Graeff doch den Satz auf, daß „der Gehalt der verschiedenen Gewebsarten an diesen nachweisbaren oxydasehaltigen Granula abhängig ist von der Intensität ihres intrazellulären Stoffwechsels, was in vielen Fällen als Ausdruck der funktionellen Bedeutung dieser Zellen angesehen werden kann".

Die Methode selbst gestaltet sich technisch folgendermaßen: Eine 1 prom. Lösung von α-Naphthol (Merck) und

einer 1,2 prom. Lösung von Dimethyl-p-phenylendiamin-chlorhydrat (Merck) werden zu gleichen Teilen gemischt. (α-Naphthol löst sich nicht sofort in Wasser, sondern erst nach Auflösung in 5—10 ccm absoluten Alkohols). Dieser Mischung, dem sog. Nadi-Gemisch, welches nie älter als 2 Tage alt sein soll, sind Puffer-Substanzen zuzusetzen, um einen geeigneten pH-Coeffizienten von 7,5, der bekanntlich dem des Kammerwassers entspricht, zu erhalten, was jedesmal mit der Michaelisschen Indikatorenreihe zu kontrollieren ist: es mußten zu 50 ccm obiger Mischung 2,9 ccm einer $^1/_{10}$ n-Natronlauge (Merck) und außerdem 12 ccm einer Glykokollösung zugesetzt werden, die so hergestellt wurde, daß 7,505 g Glykokoll (Merck) und 5,85 g Natrium chloratum in einem Liter destillierten Wassers aufgelöst wurden.

In dieses Gemisch kamen (bei Zimmertemperatur von etwa 20° C.) die mittels Gefriermikrotom hergestellten 35 μ dicken Schnitte auf durchschnittlich 20 Minuten, nach welcher Zeit sie unter Glycerin gebracht und mikroskopisch zunächst bei schwacher und dann mit Ölimmersion bei 450-facher Vergrößerung untersucht wurden.

Es sei besonders darauf hingewiesen, daß das Nadi-Gemisch durch Zusetzen von Puffersubstanzen auf einen pH-Wert von 7,5 zu bringen ist, da sonst die Reaktion versagt. Es handelt sich also bei diesem Vorgang darum, in dem nicht fixierten, mikroskopischen Schnitt durch Zusatz des Nadi-Gemisches (pH = 7,5) die Gegenwart von Oxydaseferment festzustellen und die Art seiner Verteilung und Menge im zu untersuchenden Gewebsschnitt zu beobachten.

Das Präparat wurde so hergestellt, daß ungefähr in Höhe des Äquators die vordere Hälfte des Bulbus von der hinteren durch Scherenschnitte getrennt wurde. Die anhaftende Linse wurde von den Zonulafasern vorsichtig abgelöst, dann die vordere Bulbushälfte durch einen Medianschnitt in zwei Teile geteilt. Die hintere Bulbushälfte und die eine der vorderen wurden in Formalin zwecks späterer Untersuchung gelegt. Die eine vordere Hälfte wurde durch ein scharfes Messer in kleine Streifen zerlegt, von denen je-

der ein Stück Hornhaut, den Kammerwinkel mit Iris, Sklera und Ciliarkörper umfaßte. Diese Streifen wurden auf den Mikrotomtisch gebracht und langsam durchfroren, darnach die nötigen Schnitte hergestellt. Durch das Gefrieren trat keine Vernichtung der Oxydasefermente ein, da Zupf- und Quetschpräparate den gleichen Ausfall der Indophenolblau-Reaktion erkennen ließen.

Während des Gefrierens wurde die Nadi-Lösung rasch gemischt, um die Gefrierschnitte in ganz frisches Nadi-Gemisch bringen zu können. Diese Maßnahme war deshalb von Wichtigkeit, weil sich das Nadi-Gemisch schon an der Luft rasch zu bläuen beginnt, und dann eine mehr allgemeine, unerwünschte Blaufärbung des Gewebes eintritt. Nach Fertigstellen der Lösung wurde sie sofort in den bereitstehenden Walpoleschen Komparator auf den richtigen pH von 7,5 geprüft und erforderlichen Falles noch 1—2 Tropfen Natronlauge dem Gemisch hinzugefügt, bis der gewünschte pH- im Kolorimeter festgestellt werden konnte.

Bei Anlage der z. T. schwierigen Versuche ging ich zunächst so vor, daß ich einmal die frischen Schnitte von lebenswarmen Tieraugen (Schwein und Kaninchen) sofort in eine 2 prom. wässerige Nervocidin- bzw. Erythrophleinlösung 4—10 Min. hineinlegte und von da sofort in die frischzubereitete Nadi-Lösung für ca. 20 Minuten brachte, um sie dann unter Glycerin mikroskopisch zu untersuchen (postvitale Färbung).

In einer zweiten Versuchsreihe ging ich so vor, daß das Nervocidin und Erythrophlein auf verschiedene Weise in das lebende Kaninchenauge gebracht wurde und zwar in Form der Instillation, subkonjunktivalen oder intravitrealen Injektion. Nach Beobachtung der darauf eintretenden Hypotonie des Auges wurde das Tier getötet (durch Nakkenschlag). Beide Augen, das Versuchsauge wie das unberührte Kontrollauge wurden sofort enukleiert. Während stets zuerst das Versuchsauge für die mikroskopischen Schnitte herangezogen wurde, lag das Kontrollauge solange auf Eis. Die Untersuchung geschah in der Art, daß die Schnitte vom Mikrotomtisch weg jetzt sofort in das Nadi-

Gemisch gebracht wurden und 20 Minuten später mikroskopisch untersucht werden konnten (supravitale Färbung).

Die Bezeichnung postvital und supravital wurde nur zur Unterscheidung der beiden Versuchsreihen gewählt und soll keine Gegensätzlichkeit konstruieren.

Wie schon oben erwähnt, wurde stets das Versuchsauge zuerst untersucht und erst nachher das Kontrollauge. Es war dies eine vorsichtige Maßnahme für den unerwiesenen Fall, daß vielleicht schon eine halbe Stunde post mortem durch Verwesungsprozesse eine Schädigung der Oxydasefermente eingetreten sein könnte. Für diesen Fall sollte die eventuelle Schädigung das Kontrollauge und nicht das Versuchsauge treffen, sodaß die Feststellung einer Schädigung im Versuchsauge einen größeren Wert erhalte und unanfechtbar werde.

In einer letzten Untersuchungsreihe versuchte ich nach Darreichung von Nervocidin und Erythrophlein in ein Tierauge durch intravenöse Injektion des Nadi-Gemisches eine intravitale Färbung herbeizuführen. Diese Versuche mißlangen jedoch insofern, als auch nach Zufuhr größerer Mengen von Nadi-Gemisch keine Blaufärbung des Auges zustande kam.

Bei der Beurteilung des Reaktionsausfalles unterschied ich zwischen der Stärke der Bläuung der im Mikroskop sichtbaren Epithelreihe und der Größe und Form der Körnelung des Protoplasmas. Die Bläuung konnte eben noch feststellbar sein (grau bläulich) oder sich über ein Hellblau bis zum Tiefblau des Normalpräparates steigern. Die Körnelung war feinst bis grob, je nachdem kleinste, eben noch sichtbare oder größere klumpige Körnchen in das bläuliche Zellprotoplasma eingestreut waren. Der runde bis ovale Zellkern grenzte sich meist gut als helleres Bläschen vom umgebenden Protoplasma ab. Die Zellgrenzen waren entweder deutlich oder verwaschen. Auch der Sphinkter iridis sowie der Ciliarmuskel fanden nach obigen Gesichtspunkten bei meinen Versuchen eine eingehende Beurteilung.

Untersuchungsergebnisse.

A. Normalpräparat.

Die Schnitte von frisch enukleierten Kaninchen- und Schweinsaugen kamen vom Mikrotomtisch sofort 20 Minuten lang in das Nadi-Gemisch, um dann sofort mit Ölimmersion untersucht zu werden.

Der Effekt dieser sogen. „Normal-Färbung“ war folgender: Tiefblaue Färbung des Ciliarepithels, das meist in langen Reihen dem Pigmentepithel aufsaß, mit dunkelblauer, grober Körnelung des Protoplasmas. Die runden bis ovalen Zellkerne hoben sich von dem dicht granulierten Protoplasma infolge ihrer matteren Blaufärbung scharf ab. Das Netzhautepithel, soweit es im Schnitt getroffen war, zeigte eine prachtvolle, blauschwarze Granulierung der mosaikartig aneinandergereihten Zellen (äußere und innere Körnerschicht der Retina). Der Ciliarmuskel und der Sphinkter iridis grenzten sich durch ihre diffuse Bläuung, in die feine bis grobe Körnchen in großer Zahl eingestreut waren, von der sonst ungefärbten Iris und Corp. cil. deutlich ab. Das Hornhautepithel und Endothel ließ nur eine matte, diffuse Bläuung erkennen, wobei die Epithelien palissadenartig nebeneinander lagen und eben noch sichtbare, feinste Granula enthielten. Das Hornhautparenchym, sowie die gesamte Sklera nahmen an der Blaufärbung nicht teil. Bei der Untersuchung albinotischer Kaninchen erkannte man auch im sogen. Pigmentepithel eine ausgezeichnete Bläuung und Granulierung des Protoplasmas, die sich hinsichtlich ihrer Intensität in keiner Weise von der des Ciliarepithels unterscheiden ließ .

Die sog. Normalfärbung war also durch einen starken Ausfall der Indophenolblaureaktion der färbbaren Gewebe des Auges gekennzeichnet.

B. Untersuchungsergebnisse mit der postvitalen Färbung.

Zunächst wurden die Gefrierschnitte vom Mikrotomtisch weg sofort für 4—10 Minuten in eine 1- oder 2 prom. wäs-

serige Lösung von Erythrophlein oder Nervocidin gebracht. Zur Kontrolle wurden auch einige Schnitte gerade so lang in physiologische Kochsalzlösung gelegt. Dann kamen die Präparate 20—25 Minuten in das frischbereitete Nadi-Gemisch. Die mikroskopische Untersuchung ergab, daß sich das sofort in das Nadi-Gemisch eingelegte sog. Normalpräparat von dem in physiologische Kochsalzlösung gebrachten Gewebsschnitt kaum im Ausfall der Färbung unterschied. Dagegen konnte man bei den Schnitten, welche in 2 prom. Erythrophlein-Lösung gelegen hatten, nur feinste Granulierung und matte Bläuung der Ciliarepithelien ohne deutliches Hervortreten der Zellkerne erkennen. Die Zellkonfiguration war undeutlich, verwaschen. Häufig waren die Epithelien nur als graue, ungebläute Schatten ohne irgendwelche Körnelung sichtbar. Der Sphinkter iridis und der Ciliarmuskel zeigten eine etwas bessere Bläuung und Granulierung als die Ciliarepithelien, jedoch waren auch sie stark geschädigt in Hinsicht auf Bläuung und Körnelung.

Bei den Schnitten, die in 2 prom. Nervocidin-Lösung gelegen hatten, fehlte die Bläuung und Granulierung der Ciliarepithelien vollkommen. Meist saßen die Epithelien den Pigmentepithelien nur als grauweiße Schatten auf. Auch der Irissphinkter, sowie der Ciliarmuskel waren nur hie und da eine Spur gebläut und feinst granuliert. Die deutliche Zellkonfiguration fehlte allen Epithelien. Auch das Cornealepithel ließ so gut wie keine Bläuung erkennen.

Zusammenfassend läßt sich also über den Ausfall der postvitalen Färbung sagen, daß sämtliche Schnitte unter der rein toxischen Einwirkung von 2 prom. Erythrophlein und Nervocidin sehr stark gelitten hatten insofern, als die prachtvolle Bläuung und Granulierung des Normalpräparates überall fehlte. Während die Nervocidin-Schnitte fast durchweg keine Granulierung und Bläuung ergaben, ließ sich bei den Erythrophlein-Schnitten öfter noch eben eine matte, rauchiggraublaue Färbung und selten auch eine feinste Körnelung feststellen.

C. Untersuchungsergebnisse mit der supravitalen Färbung.

Diese Versuche waren dadurch charakterisiert, daß sterile 2 prom. Nervocidin- und Erythrophleinlösungen ins Auge eingeträufelt, bzw. subkonjunktival oder in den Glaskörper injiziert wurden und nach eingetretener Hypotonie das Auge enukleiert und dann sofort der Untersuchung zugeführt wurde. Das andere, unbeeinflußte Auge diente als Kontrolle. Die Schnitte kamen nach der Enukleation sofort 20 Minuten lang in das Nadi-Gemisch, welches während des Gefrierens der Schnitte hergestellt wurde.

Es wurde folgende Beobachtung gemacht:

a) nach Instillation von 10 Tropfen 2 prom. Nervocidins innerhalb von 10 Minuten (Tötung des Tieres ca. 3 Stunden post instillationem):

Hellblaue Färbung der Ciliarepithelien und feine bis mittelgrobe Granulierung des Protoplasmas. Zellkonfiguration besser als in den „Erythrophlein-Schnitten", jedoch auch hier undeutliche Zellgrenzen und verwaschene Zellkerne; Sphinkter iridis meist sehr gut gebläut und granuliert.

b) nach Instillation von 10 Tropfen 2 prom. Erythrophleins innerhalb 10 Minuten (Tötung des Tieres ca. 3 Stunden post instillationem):

Matte Bläuung und feinste bis mittelgrobe Körnelung der Ciliarepithelien; Zellkonfiguration häufig undeutlich; Sphinkter iridis normal gebläut und granuliert.

Zusammenfassung: Nach Instillation der 2 prom. Lösung des Nervocidins und Erythrophleins trat klinisch eine mäßig starke Schwellung der Konjunktiva und im Schnitt eine deutliche Abschwächung der Indophenolblau-Reaktion ein, nach Erythrophlein in höherem Grade als nach Nervocidinapplikation.

c) nach subkonjunktivaler Injektion von 0,3 bis 0,5 ccm 2 prom. steriler Erythrophleinlösung (Tötung des Tieres 3 Stunden bis 2 Tage post inject): feinste bis mittelgrobe, in manchen Schnitten sogar grobe

Körnelung und oft abgeschwächte, hellbläuliche Färbung der Ciliarepithelien; deutliche Kernzeichnung und gute Zellkonfiguration; der Sphinkter iridis meist normal gebläut und granuliert. An manchen Schnitten sogar prachtvolle Bläuung und Granulierung wie im Normalpräparat.

d) nach subkonjunktivaler Injektion von 0,3—0,5 ccm 2 prom. steriler Nervocidin-Lösung (Tötung des Tieres 3 Stunden bis 2 Tage post inject): Ähnlich den Erythrophlein-Schnitten. Während viele Schnitte eine geringe Abweichung vom Normalpräparat hinsichtlich Bläuung, Granulierung und Zelldifferenzierung aufwiesen, traf man doch häufig Schnitte mit prachtvoller Bläuung und grober Granulierung an, die dem Ausfall der Färbung am Kontrollauge in nichts nachstanden.

Zusammenfassung: Nach subkonjunktivaler Injektion einer 2 prom. sterilen Lösung von Nervocidin und Erythrophlein war nur eine geringe Schädigung, an vielen Schnitten keine Schädigung, d. h. keine Abschwächung der Indophenolblau-Reaktion an den Ciliarepithelien nachzuweisen. Klinisch waren aber bei allen Versuchen (8 Tiere!) Chemosis der Conjunctiva, umschriebene Trübung der Cornea, Trübung des Kammerwassers und iritische Reizerscheinungen zu beobachten!

e) nach Einspritzung in den Glaskörper von 0,05 ccm 2 prom. steriler Nervocidin-Lösung (Tötung der Tiere 3 Std. bis 2 Tage post inject):

Hellgrau bis mattblau gefärbte Ciliarepithelien; die tiefblaue Protoplasma-Färbung fehlte überall; undeutliche bis feine Körnelung des Protoplasmas; Zellgrenzen häufig verwaschen. Kerne schlecht abgehoben vom Protoplasma. Der Sphinkter iridis und Ciliarmuskel besser gefärbt, aber nicht so gut wie bei dem Normalpräparat.

f) nach Einspritzung in den Glaskörper von 0,05 ccm 2 prom. steriler Erythrophlein-Lösung (Tötung der Tiere 3 Std. bis 2 Tage post inject).

Auch diesen Schnitten fehlte durchweg die schöne Bläuung und Granulierung des Normalpräparates; manche Epi-

thelreihen zeigten kaum einen graublauen Ton; häufig fehlte jegliche Granulierung; meist feine Körnelung und mattblaue Protoplasmafarbe; Zellkonfiguration meist schlecht, Zellgrenzen verwischt. Auch der Sphinkter erreichte selten normale Blaufärbung und Granulierung.

Zusammenfassung: Nach Einspritzung von steriler 2 prom. Nervocidin- und Erythrophleinlösung in den Glaskörper war meist deutliche, aber keine schwere Schädigung der Ciliarepithelien hinsichtlich Bläuung, Granulierung und Zellkonfiguration zu beobachten. Geringe Schädigung des Sphinkter iridis und Ciliarmuskels. Klinisch bestand nach der Injektion in den Glaskörper immer eine schwere serofibrinöse (bzw. eitrige) Iritis.

Um zu sehen, wie andere drucksenkende Pharmaka auf das Ciliarepithel wirkten, wurden auch Parallelversuche mit Cyankali und Suprarenin angestellt, über deren Wirkung auf das Ciliarepithel des Tierauges bereits Schmelzer 1925 berichtet hat. Dabei ergab sich, daß diese Mittel ähnlich wie Nervocidin und Erythrophlein auch bei Untersuchung mit der postvitalen Färbung alle eine mehr oder minder deutliche Schädigung des Ciliarepithels bewirkten, bei Untersuchung mit der Supravital-Färbung aber nur z. T. einen schädigenden Effekt hervorbrachten.

Diese Versuche mit der postvitalen Färbung wurden in derselben Weise durchgeführt wie die Untersuchungen mit Nervocidin und Erythrophlein, allerdings nur am Schweinsauge:

Die Augen von eben geschlachteten Schweinen wurden eröffnet und ein Streifen des vorderen Augenabschnittes mit Ciliarkörper, Iris, Hornhaut und Sklera auf dem Gefriermikrotom in Schnitte zerlegt, die sofort in eine wässerige Lösung der zu untersuchenden Mittel gelegt wurden (immer 4—10 Minuten lang), um hernach sofort in das frischbereitete Nadi-Gemisch gebracht zu werden. Nach durchschnittlich 20 Minuten kamen die Schnitte zur mikroskopischen Untersuchung.

Am auffallendsten war die schädigende Wirkung auf den Ausfall der Färbung nach Einlegen der Schnitte in Cyankali-Lösung von $^1/_{1000}$ oder $^1/_{100}$ molar.

Die Schnitte boten nämlich das Bild völliger Zerstörung und Auflösung des Gewebes. Normale Zellformen waren nirgends mehr deutlich zu erkennen. Das Pigmentepithel hatte sich zu unförmigen Klumpen zusammengeballt, während das übrige Gewebe schmutziggrau verfärbt war. Von einer Blaufärbung war auch nicht die Spur zu sehen.

Nach Behandlung der Schnitte mit der Stammlösung des Suprarenins (1 : 1000) lagen die Verhältnisse ähnlich: von einer Granulierung fehlte auch hier jegliche Spur. Allerdings ließ sich eine matte Bläuung des Protoplasmas feststellen, wobei jedoch die Grenzen der Zellen und ihrer Kerne fast gänzlich verwischt waren. Auch der Sphinkter iridis zeigte nur eine matte Bläuung ohne jegliche Granulierung.

Zusammenfassend läßt sich also über diese Versuche mit der postvitalen Färbung sagen, daß Cyankali das Gewebe schwer schädigt und Suprarenin in der Stammlösung so stark wirkt, daß keine Granulierung des Protoplasmas der Zellen und nur eine matte Bläuung der Ciliarepithelien und des Sphinkter iridis zustande kommt.

Die Versuche mit der supravitalen Färbung wurden so angelegt, daß Suprarenin in einer Menge von 0,5 ccm unter die Bindehaut, bzw. 0,05 bis 0,1 ccm in den Glaskörper gespritzt, Cyankali nur in den Glaskörper injiziert wurde. — Um die Wirkung einer rein bakteriellen Entzündung auf das Ciliarepithel zu studieren, wurde bei drei Kaninchen auch eine Aufschwemmung von Koch-Weeksbazillen in den Glaskörper eingespritzt. —

A. Subkonjunktivale Injektion von Suprarenin (1 : 1000):

Diese Versuche zeigten bei sämtlichen Schnitten kaum eine Schädigung der Ciliarepithelien, ob nun die Bulbi wenige Stunden oder erst einige Tage nach der Injektion und der darnach beobachteten, durch tonometrische Messung festgestellten Hypotonie enukleiert und im Nadi-Gemisch

gefärbt wurden. Bei sämtlichen Versuchen erreichten Bläuung, Granulierung und Zellkonfiguration fast dieselbe Intensität wie beim Normalpräparat.

B. Injektion von Suprarenin (1 : 1000) in den Glaskörper: Es wurden entweder 0,05 bis 0,1 ccm des sterilen Mittels in das unberührte Auge injiziert oder nach vorheriger Punktion der Vorderkammer ca. 0,3 ccm in den Glaskörper gespritzt. Das Ergebnis der mikroskopischen Untersuchung der so vorbehandelten Augen war folgendes:

Deutliche Abschwächung insofern, als zwar feine bis feinste Körnelung und hellblaue Färbung erzielt, jedoch die Normalfärbung nie erreicht wurde; die Zellkonfiguration war durchschnittlich gut; der Sphinkter iridis zeigte kaum eine Schädigung.

C. Injektion von Cyankali-Lösungen $^1/_{1000}$ und $^1/_{100}$ molar in den Glaskörper:

Diese Versuche zeitigten folgendes Ergebnis: Feine Granulierung und hellblaue Protoplasma-Färbung, also eine deutliche Abschwächung der Indophenolblau-Reaktion und zwar in stärkerem Maße bei Injektion von $^1/_{100}$ molarer Lösung. Cyankali in $^1/_{10}$ Molar-Lösung bewirkte eine matte Bläuung ohne eine Spur von Granulierung. Klinisches Bild: blasses Auge, keine Reizerscheinungen.

D. Injektion von 0,1 ccm einer Aufschwemmung von Koch-Weeksbazillen in den Glaskörper:

Bei diesen Versuchen ergab sich, daß das Ciliarepithel ebenso wie der Sphinkter iridis und Ciliarmuskel (und die Netzhaut) immer dasselbe Aussehen boten wie das Normalpräparat, daß also trotz starker entzündlicher Erscheinungen der Augen keine durch die Nadi-Reaktion nachweisbare Schädigung der Ciliarepithelien zu beobachten war. Ein Tag post inject. bestanden nämlich am Versuchsauge klinisch schon alle Zeichen einer schweren akuten Iridocyclitis: Trübung des Kammerwassers, frische hintere Synechien, oft Hypopyon.

Intravitale Färbungsversuche.

Durch intravenöse Einspritzung von 25—60 ccm des Nadi-Gemisches in die Ohrvenen ausgewachsener Kaninchen wurde eine Färbung der Ciliarepithelien in vivo versucht. Diese Versuche schlugen jedoch immer fehl; es ließ sich niemals auch nur eine Spur von Bläuung und Körnelung der Augengewebe nachweisen.

Die Tiere vertrugen übrigens die Einspritzungen ohne irgendwelche Reaktionserscheinungen. — Wahrscheinlich konnte eben doch nicht das Nadi-Gemisch in der notwendigen Konzentration an Ort und Stelle gebracht werden.

Nebenbei sei erwähnt, daß Leber, Nieren und Herzmuskel in die Nadi-Lösung gebracht, die gleiche prachtvolle, tiefblaue Färbung ergaben wie die Netzhaut und die Ciliarrepithelien des Normalpräparates des Kaninchen- oder Schweinsauges.

Ergebnisse.

Es wurde mittels der Supravitalfärbung der Ciliarepithelien versucht, die Frage zu klären, ob durch eine 2-prom. wässerige Lösung von Nervocidin und Erythrophlein eine Schädigung dieser Epithelien hervorgerufen wird. Zu diesem Zwecke wurden in zwei großen Versuchsreihen frische Schweins- und Kaninchenaugen zuerst der postvitalen Färbung und dann der supravitalen Färbung unterworfen. Die postvitale Färbung wurde so ausgeführt, daß die frischen Gefrierschnitte für 5—10 Minuten in die entsprechende Lösung gelegt und anschließend im Nadi-Gemisch gefärbt wurden. Bei der supravitalen Färbung wurde das Versuchsauge erst mit Nervocidin- oder Erythrophleinlösung vorbehandelt und dann nach Tötung des Tieres und Enukleation der Augen die sofortige Färbung der frischen Schnitte im Nadi-Gemisch vorgenommen.

Es ergab sich bei den Versuchen mit der postvitalen Färbung folgendes: Starke Schädigung der Ciliarepithelien, sowie der Netzhaut des Ciliarmuskels und Iris-Sphinkters. Bei der Versuchsreihe mit der supravitalen Färbung war ebenfalls eine deutliche Abschwächung hin-

sichtlich der Bläuung und Körnelung des Ciliarepithels durch Nervocidin- und Erythrophleinlösung gegenüber dem Kontrollauge nachweisbar und zwar in stärkerem Grade nach Injektion in den Glaskörper, schwächer nach Instillation und Einspritzung unter die Bindehaut.

Aus diesen Versuchen kann man auf eine Schädigung (reversiblen Vergiftung!) des Ciliarepithels durch die Applikation von 2-prom. Lösung des Nervocidins und Erythrophleins am Tierauge schließen. Da wir in dem Ciliarepithel mit Seidel die Quelle der inneren Augenflüssigkeit erblicken, ist es naheliegend, die augendrucksenkende Wirkung dieser beiden Pharmaka auf eine sekretorische Hemmung des Ciliarepithels zurückzuführen.

Ob allerdings die augendrucksenkende Wirkung des Nervocidins und Erythrophleins ausschließlich durch eine Sekretionshemmung der Ciliarepithelien auf Grund einer reversiblen Vergiftung zustande kommt, ist fraglich; denn es tritt nach Applikation dieser Mittel am Tierauge immer eine starke entzündliche Reizung des Versuchsauges auf, wie z. B. Chemosis der Bindehaut, Trübung des Kammerwassers, Hyperämie der Iris usw. Diese entzündlichen Erscheinungen können aber vielleicht an sich auf noch ungeklärte Weise eine Hypotonie des Auges bewirken, ähnlich der häufig zu beobachtenden Hypotonie bei Iritis und Keratitis des Menschenauges und der bakteriell erzeugten Iridocyclitis des Kaninchenauges (Versuche mit Koch-Weeksbazillen). Daß die drucksenkende Wirkung durch Nervocidin und Erythrophlein nicht auf eine genügend starke Pupillenverengerung und dadurch bewirkte Erleichterung des Kammerwasserabflusses zurückzuführen ist, wie das für die Miotika nach Seidel und Seer erwiesen ist, schließen die klinischen Untersuchungen Schmelzers aus.

Es sei noch darauf hingewiesen, daß man bis heute nicht in der Lage ist, nach Ausführung der Nadi-Reaktion Dauerpräparate herzustellen, da Indophenolblau nicht in eine unlösliche beständige Verbindung überführt werden kann. Deshalb waren wir gezwungen, von einer großen Reihe mikroskopischer Präparate möglichst naturgetreue Bilder von unserer Universitätszeichnerin (Frl. Riezler) anfertigen zu lassen, die in dem Laboratorium der Universitäts-Augenklinik-Erlangen aufbewahrt bleiben.

Da aber bei der Untersuchung der Einwirkung von Suprarenin- und Cyankali-Lösung auf das Tierauge, die ebenfalls den Augendruck herabsetzen, in unseren

Versuchen ebenfalls eine deutliche Schädigung der Ciliarepithelien nachgewiesen werden konnte, ohne daß sichtbare entzündliche Erscheinungen auftreten, dürfte wohl auch die hypotonisierende Wirkung von Nervocidin und Erythrophlein in erster Linie auf ihrer toxischen Einwirkung auf das Ciliarepithel beruhen.

Meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Oberarzt Dr. Schmelzer, möchte ich auch an dieser Stelle für die Überlassung der interessanten Arbeit und die überaus freundliche Unterstützung bei den z. T. schwierigen Versuchen und der Sichtung einer umfangreichen Literatur herzlich danken.

Literatur.

1. Leber: Die Zirkulations- und Ernährungsverhältnisse des Auges. v. Graefe-Sämisch's Handbuch, 2. Aufl. 1903.
   Leber u. Bentzen: Über die Filtration der Vorderkammer bei normalen und glaukomatösen Augen. v. Graef. Arch. f. Ophth. 41, H. 3, S. 208. 1895.
2. Seidel: Experimentelle Untersuchungen über die Quelle und den Verlauf der intraokularen Saftströmung. v. Graef. Arch. f. Ophth. 95, 1. 1918.
   Seidel: Weitere Untersuchungen über die Quelle und den Verlauf der intraokularen Saftströmung. v. Graef. Arch. f. Ophth. 101—114, 1.—24. Mitteilung.
3. Schmelzer: Zur Pathologie und Therapie d. Glaukoms. v. Graef. Arch. f. Ophth. 120, 14. 1928.
4. Ascher: Über die langdauernde Herabsetzung des Augendrucks durch ein Anaesthetikum. Bericht über die 47. Versammlg. d. Deutsch. Ophth. Ges. in Heidelberg, 1928, S. 207.
5. John: Die praktische Anwendung des Nervocidin als schmerzstillendes, entzündungshemmendes und druckherabsetzendes Mittel in der Augenheilkunde. v. Graef. Arch. f. Ophth. 123, S. 272. 1930.
6. Schmelzer: Das Nervocidin in der Augenheilkunde. Vortrag geh. am 23. X. 30 auf d. 5. Vers. bayer. Augenärzte in Erlangen (erscheint ausführl. in Graef. Arch. f. Ophthl. 1931. „Das Erythrophlein in der Augenheilkunde" ersch. in d. Zeitschr. f. Aug. 1931).
7. Schmelzer: Mikrochemische Reaktionen am Ciliarepithel. Vortrag geh. auf d. 45. Vers. d. Ophth. Gesellsch. in Heidelberg. 1925, S. 259.
8. Schall: Das Vorkommen der Nadioxydasen in den Gewebszellen des Auges in seinen verschiedenen Entwicklugsstufen. v. Graef. Arch. f. Ophth. 115, S. 666. 1925.
9. Graeff: Die mikro-morphologischen Methoden der Fermentforschung im tierischen und pflanzlichen Organismus. Handb. d. biol. Arbeitsmethod. Abt. 4, Teil I, Heft 1. 1922.

Lebenslauf.

Friedrich Pfeuffer wurde am 19. September 1905 als Sohn des Pfarrers Christoph Pfeuffer, sowie seiner Ehefrau Helene Pfeuffer, geb. Kirsch zu Allershausen bei Freising geboren. Von 1911—1914 besuchte er die Volksschule in Kirnberg bei Rothenburg o. T., von 1915—1921 das Gymnasium in Ansbach, ab 1921 das Gymnasium in Erlangen, welches er im April 1925 mit dem Reifezeugnis verließ.

Im S. S. 1925 studierte er in Erlangen zunächst 1 Semester lang Theologie, vom W. S. 1925/26 ab Medizin. Im November 1927 bestand er das Physikum.

Im W. S. 1927/28 besuchte er die Universität Leipzig, im S. S. 1929 die Universität Berlin. Die übrigen klinischen Semester verbrachte er in Erlangen, wo er am 30. Dezember 1930 das medizinische Staatsexamen bestand.

Vom 31. Dezember 1930 bis 31. März 1931 war er als Medizinalpraktikant in der Universitäts-Augenklinik in Erlangen tätig.